

УДК 576.895.122.577.112.083

© 1990

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА БЕЛКОВОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ВИДОВОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОФАЛЛИД ГРУППЫ «PYGMAEUS» (TREMATODA: MICROPHALLIDAE)

Н. А. Михайлова, О. И. Подгорная, К. В. Галактионов

Методом ДДС-На-диск электрофореза исследован общий состав белков четырех видов *Microphallus*: *M. pygmaeus*, *M. piriformes*, *M. sp. I* и *M. triangulatus*. На электрофореграммах межвидовые отличия обнаруживаются в основном на уровне разной интенсивности белковых зон и только в немногих областях выявляются несоответствия в распределении мажорных белков. Предполагается, что столь незначительные различия определяются высокой специализацией микрофаллидных трематод, а также сходством морфологии и схем протекания жизненных циклов изученных видов. Дискутируется вопрос о путях становления микрофаллид группы «*pygmaeus*».

Электрофорез белков прочно вошел в арсенал методов современной паразитологии. Он широко применяется при разделении близкородственных видов и выявлении внутривидовых группировок разного ранга (Bray, Rollinson, 1985; Cianchi e. a., 1985; Renaud e. a., 1986, и др.). Мы попытались провести такого рода исследование на представителях высокоспециализированных трематод сем. Microphallidae, видовая диагностика которых затруднительна из-за малого числа контрастных морфологических признаков. В качестве объекта выбраны 4 вида микрофаллид группы «*pygmaeus*» (*Microphallus pygmaeus* (Levinsen, 1881), nec Odhner, 1905, *M. piriformes* (Odhner, 1905) Galaktionov, 1983, *M. triangulatus* Galaktionov, 1984 и *M. sp. I* Galaktionov, 1980), которые чрезвычайно сходны по морфологии и ранее описывались под общим названием *Microphallus pygmaeus* (Levinsen, 1881) (Белопольская, 1952; Галактионов, 1980, 1983, 1984). Жизненные циклы этих форм протекают по одной схеме: партеногенетические поколения развиваются в морских литоральных моллюсках рода *Littorina*; второй промежуточный хозяин отсутствует, а метацеркарии созревают внутри дочерних спороцист; окончательный хозяин — морские птицы (в основном обыкновенная гага *Somateria mollissima*) — заражается при поедании литторин, содержащих инвазионные метацеркарии (Белопольская, 1949; Галактионов, 1983, 1984). В зараженном моллюске созревание личинок происходит синхронно во всех спороцистах. Это позволяет относительно легко получать достаточное для проведения электрофореза количество однородного материала: метацеркарий, находящихся на одной стадии развития. Изучение белкового состава личинок микрофаллид группы «*pygmaeus*» проводилось методом электрофореза в полиакриламидном геле с ДДС-На, который обладает высокой разрешающей способностью и позволяет определять молекулярные массы белков.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Метацеркарии микрофаллид группы «*pygmaeus*»: *M. pygmaeus*, *M. piriformes*, *M. triangulatus*, *M. sp. I* были получены из зараженных моллюсков *Littorina saxatilis*, собранных в губе Ярнышная Баренцева моря в период с декабря 1986 по апрель 1987 г. Инвазионных метацеркарий микрофаллид механически извлекали под биноклем, разрывая спорцисты препаровальными иглами. Трематод тщательно отмывали раствором Рингера для холоднокровных животных от тканей хозяина (кусочков печени, гонад и т. д.). Анализ белкового состава проводился при помощи электрофореза с ДДС-Na в полиакриламидном геле (ПААГ), в трис-глициновой системе Леммли (Laemmly, 1970). Сущность метода заключается в разделении смеси белков, обработанных анионным детергентом додецил-сульфатом натрия (ДДС-Na). Смесь белков под действием электрического поля в ПААГ разделяется на полипептиды, которые распределяются в соответствии с их молекулярными массами (м. м.). Для удобства здесь и далее эти полипептидные фракции мы будем именовать белками.

Для приготовления проб червей помещали в пробирки Эппендорф в 1%-ный раствор ДДС-Na, содержащий также 5 % β -меркаптоэтанола и 10 % глицерина. Пробу тщательно перемешивали, инкубировали при 100° на водяной бане в течение 3—4 мин и перед нанесением охлаждали до комнатной температуры. Пробы наносили на блок немедленно или хранили при —20°. Хранение проб в течение 3 сут не сказывалось на картине распределения зон. Количество белкового материала было выравнено при помощи подсчета животных, помещенных в пробу. Полученные гели фиксировали в течение 8—10 ч (45 % спирта, 10 % уксусной кислоты), окрашивали 0.25%-ным раствором красителя Кумасси бриллиантового синего в течение 1.5 ч и отмывали 7%-ной уксусной кислотой. Для определения м.м. полипептидов использовали ацетоновый препарат миофибрилл кролика, который обрабатывали по общей схеме и наносили на одну, две дорожки каждого геля.

При данном типе электрофореза важны точные значения рН используемых буферов. Микровариации этих значений приводят к «растяжению» или «сжатию» тех или иных зон определенных м.м. Наша работа проводилась в разное время и в различных условиях, поэтому на полученных электрофореграммах можно наблюдать такие вариации. Однако на каждый гель наносили маркер м.м., что позволило сравнивать разные электрофореграммы нескольких электрофорезов. В настоящей статье на рисунках белки одинаковых молекулярных масс соединены линиями. На рисунке картины распределения белковых зон для некоторых изученных видов продублированы. Кроме того, на рисунке, А (5, 6) приведены электрофореграммы, полученные для марит *M. pygmaeus* и *M. piriformes*, выращенных в искусственной среде (время инкубации — 1 сут). Отсутствие существенных качественных различий по белковому составу между метацеркариями и маритами ранних сроков культивирования при описанном методе окраски позволило нам использовать их для разделения видов рода *Microphallus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Многочисленные исследования метацеркарий *M. pygmaeus*, *M. piriformes*, *M. sp. I* и *M. triangulatus* показали, что для каждого вида может быть определена характерная картина распределения белковых зон, воспроизводящаяся от опыта к опыту (см. рисунок). Используемый тип электрофореза позволил дифференцировать на электрофореграммах 50—60 мажорных белков. Большинство из них — общие для всех четырех видов, но вместе с тем обнаруживаются и видоспецифичные различия как качественного, так и количественного характера. В настоящее время трудно идентифицировать белки, соответствующие

той или иной зоне на электрофореграмме. Однако сравнение полученных нами картин с аналогичными данными по разным типам клеток эукариот, белковый состав которых известен, позволило предположить, что присутствующий у метацеркарий всех изученных нами видов белок с м.м. 42 кД является актином, а группа белков от 20 до 16 кД с характерным распределением — коровыми гистонами.

Наиболее сходны по белковому составу виды *M. pygmaeus* и *M. piriformes*. Для них характерны слабые качественные различия всего трех белковых зон, в областях 60, 55, 38 кД. Вид *M. sp. I* отличается от *M. pygmaeus* и *M. piriformes* более существенно. Для него характерно ослабление интенсивности целой группы белковых зон в области м.м. от 170 до 80 кД, слабые качественные отличия по белкам с м.м. 38—30 кД. Однако по картине распределения зон с меньшими м.м., вид *M. sp. I* ближе к *M. pygmaeus*, чем к *M. piriformes*.

Для вида *M. triangulatus* пока не удалось получить целостной картины распределения белковых зон. Это определяется малым количеством бывшего в нашем распоряжении материала (*M. triangulatus* встречается в природе значительно реже других представителей группы «*pygmaeus*»), а также тем, что для электрофореграмм метацеркарий *M. triangulatus* в значительной степени свойственно повреждение геля, связанное с присутствием ДНК. При дальнейшей работе с этим видом следует проводить обработку пробы ДНКазой. В настоящее время мы располагаем лишь фрагментом электрофореграммы (см. рисунок, Б) в области разделения низкомолекулярных белков. Однако и по нему отчетливо видны существенные и количественные отличия *M. triangulatus* от всех остальных видов группы «*pygmaeus*». Они связаны с группами белков, имеющих молекулярные массы 35—33 кД, 31—29, 27—25 кД. По сравнению с *M. pygmaeus* (см. рисунок, Б) в каждой из этих областей у метацеркарий *M. triangulatus* отсутствует одна из зон, а в областях 32—29 и 27—25 кД обнаруживаются дополнительные белковые зоны с иными молекулярными массами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофорез общих белков, как инструмент для разделения видов трематод, пока еще использован только для представителей родов *Paragonimus* и *Schistosoma*. В серии исследований Йошимура с соавт. (Yoshimura, 1969a, 1969b; Yoshimura e. a., 1969) приведены данные по электрофорезу (недетергентному) тотальных белков марит четырех видов *Paragonimus*: *P. westermani*, *P. ohirai*, *P. miyazakii* и *P. iloktsuemensis*. Сравнение велось по денситометрическим профилям, полученным с электрофореграмм в ПААГ. Обнаружилось, что по числу пиков мажорных белков перечисленные виды существенно отличаются, причем даже такие близкие, как *P. ohirai* и *P. iloktsuemensis*. Значительные отличия по белковому составу демонстрируют также виды *Schistosoma mansoni* и *S. japonicum* на стадиях мариты (Yoshimura, 1968) и шистосомулы (Maeda e. a., 1984). Так, на электрофореграммах тотальных белков шистосомул, полученных методом электрофореза с ДДС-На, выявляется около 40 белковых зон, из которых общими для обоих видов оказываются только 5, в областях 30, 34, 44, 54 и 70 кД (Maeda e. a., 1984).

Высокая разрешающая способность детергентного электрофореза позволяет выявить в общем рисунке белковых зон различия не только видового ранга, но и на уровне рас, штаммов, линий и тому подобных внутривидовых группировок. В этом плане интересна работа Раффа с соавт. (Ruff e. a., 1973), выполненная на самках и самцах трех линий (*Japanese*, *Philippine* и *Formosan*) *S. japonicum*. Сравнивали денситометрические профили, полученные в колонках полиакриламидного геля. У самцов разных линий выявлены наборы видоспецифических пиков мажорных белков: *Japanese* — номера 20, 29, 31, *Philippine* —

25, 34: *Formosan* — 8, 12, 15. Для самок характерны три группы пиков: 1—14, 15A, 18, 19; 2 — 15; 3 — 12, 20, 35 соответственно. В ходе анализа денситометрических профилей было обнаружено, что шистосомы линий *Japanese* и *Formosan* ближе по белковому составу, чем *Japanese* — *Philippine* или *Formosan* — *Philippine*. В отличие от двух других линий у самцов линии *Philippine* отсутствуют пики 9, 26, 32, самкам свойственны пики 13, 17, 30. Каждая раса трематод паразитирует в определенном подвиде моллюсков рода *Oncomelania*. Оказалось, что подвиды *O. h. formosana* и *O. h. nosophora*, в которых паразитируют линии *Formosan* и *Japanese*, очень близки по происхождению. Вероятно, по мере расхождения соответствующих подвидов паразиты адаптировались к изменениям внутренней среды хозяев.

Из приведенного обзора литературы следует, что различия общего белкового состава близкородственных видов трематод, исследованных к настоящему времени методом электрофореза, носят качественный характер и затрагивают значительное число, если не большинство, мажорных белков. В противовес этому у микрофаллид группы «*pygmaeus*» видовые отличия проявляются в большей степени на уровне разной интенсивности белковых зон, и только *M. triangulatus* дифференцируется от остальных видов несовпадением распределения мажорных белков в трех областях электрофореграмм. Таким образом, 4 изученных нами вида рода *Microphallus* более близки по составу тотальных белков, чем отдельные линии *S. mansoni*.

Обнаруженное несоответствие обусловливается, на наш взгляд, двумя причинами. Прежде всего необходимо учитывать, что микрофаллиды — одно из наиболее специализированных семейств высших трематод, для эволюции которого характерен далеко зашедший процесс ювенилизации особей гермафродитного поколения и, как следствие этого, их миниатюризации (Галактионов, Добровольский, 1987). Последнее и определило высокий морфологический консерватизм микрофаллид и, возможно, привело к известной стабилизации их белкового состава. Кроме того, как уже отмечалось ранее, исследованные виды микрофаллид группы «*pygmaeus*» чрезвычайно близки по морфологии, а их жизненные циклы протекают по общей схеме.

Исходя из данных электрофореза, можно предположить, что первоначально от общего ствола микрофаллид группы «*pygmaeus*» отделился вид *M. triangulatus*, наиболее сильно отличающийся по белковому составу от остальных представителей группы. *M. triangulatus* редок, заражение им первых промежуточных хозяев — литторин на побережье Баренцева и Белого морей локально и никогда не превышает 1—2 % (Галактионов, 1980). *M. pygmaeus* и *M. piriformes* — массовые паразиты литторин, экстенсивность инвазии которыми в ряде популяций моллюсков достигает 60—70 % для особей старших возрастных классов. Дивергенция этих видов, возможно, определялась приспособлением к разным окончательным хозяевам. Хотя мариты *M. piriformes* (s.p.): *M. pygmaeus* forma A James, 1968) и *M. pygmaeus* обладают довольно широкой специфичностью, но первые находят лучшие условия для развития в чайках, а вторые — в утках (в первую очередь в обыкновенной гаге) (James, 1968, 1971; Галактионов, 1987). Вид *M. sp. I*, вероятно, выделился из *M. pygmaeus*, к которому он ближе по белковому составу, чем к *M. piriformes*. Становление *M. sp. I* скорее всего связано с использованием в качестве первого промежуточного хозяина иных, кроме литторин, видов переднежаберных моллюсков. Действительно, экстенсивность инвазии *M. sp. I* представителей рода *Littorina* сравнима с аналогичными показателями для *M. triangulatus*. В то же время зараженность сублитторальных гастропод *Onoba aculeus*, *Epheria vineta*, *Margarites helicina* и ряда других этой формой достигает в некоторых районах Баренцева и Белого морей 30—40 % (наши данные). Следует отметить, что метацеркарии *M. sp. I* в каждом из перечисленных видов моллюсков несколько отличаются по пропорциям тела. Возможно, мы сталкиваемся здесь с разными ли-

ниями *M. sp. I*, как это имеет место у *S. mansoni*, или с группировками более высокого ранга, вплоть до видового (Галактионов, 1986). Точно ответить на этот вопрос помогут дальнейшие исследования жизненных циклов микрофаллид, включающие как важный компонент метод белкового электрофореза.

Список литературы

- Белопольская М. М. Цикл развития трематоды *Spelotrema pygmaeum*, паразитирующей у птиц // ДАН СССР. 1949. Т. 66, № 1. С. 133—135.
- Белопольская М. М. Трематоды семейства Microphallidae Travassos, 1920 // Трематоды животных и человека. Т. 6. 1952. С. 618—756.
- Галактионов К. В. Четыре типа метацеркарий рода *Microphallus* из моллюсков *Littorina saxatilis* и *L. obtusata* Баренцева и Белого морей // Вест. ЛГУ. 1980. № 3. С. 21—28.
- Галактионов К. В. Микрофаллиды группы «*pygmaeus*». I. Описание видов *Microphallus pygmaeus* (Levinsen, 1881) Nec Odhner, 1905 и *M. piriformes* (Odhner, 1905) Nom Nov (Trematoda: Microphallidae) // Вест. ЛГУ. 1983. № 15. С. 20—30.
- Галактионов К. В. Микрофаллиды группы «*pygmaeus*». II. Описание вида *Microphallus triangulatus* sp. nov. (Trematoda: Microphallidae) // Вест. ЛГУ. 1984. № 3. С. 5—11.
- Галактионов К. В. Метацеркарии семейства Microphallidae Travassos, 1920 из бентических моллюсков юго-восточной части Баренцева моря // Паразитология. 1986. Т. 20, вып. 5. С. 389—396.
- Галактионов К. В. Жизненные циклы трематод литоральных биоценозов // Жизненные циклы паразитов в биоценозах северных морей. Апатиты: изд-во Кольского филиала АН СССР, 1987. С. 8—30.
- Галактионов К. В., Добровольский А. А. Гермафродитное поколение трематод. Л.: Наука, 1987. 193 с.
- Braun R. A., Rollinson D. Enzyme electrophoresis as an aid to distinguishing species of *Fellodistomum*, *Steringotrema* and *Steringophorus* (Digenea: Fellodistomatidae) // Int. J. Parasitol. 1985. Vol. 15, N 3. P. 255—263.
- Cianchi R., Karam M., Henry M. C., Villani F., Kumlien S., Bullini L. Preliminary data on the genetic differentiation of *Onchocerca volvulus* in Africa (Nematoda: Filarioideae) // Acta trop. 1985. Vol. 42, N 4. P. 341—351.
- James B. L. Studies on the life cycle of *Microphallus pygmaeus* (Levinsen, 1881) (Trematoda: Microphallidae) // J. Nat. Hist. 1968. Vol. 2, N 3. P. 329—343.
- James B. L. Host selection and ecology of marine digenean larvae // 4th Eur. Mar. Biol. Symp. 1971. P. 179—196.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. N 227. P. 680—685.
- Maeda S., Irie Y., Yasuraoka K. Comparison of protein composition between *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* // Parasitology. 1984. Vol. 89, part 3. P. 453—459.
- Renaud F., Gaborion C., Pasteur H. Geographical divergence in *Bothriocephalus* (Cestoda) of fishes demonstrated by enzyme electrophoresis // J. Parasitol. 1986. Vol. 16, N 5. P. 553—558.
- Ruff M. D., Davis G. M., Werner J. K. *Schistosoma japonicum*: Disc electrophoretic protein patterns of the Japanese, Philippine, and Formosan strains // Exp. Parasitol. 1973. Vol. 33, N 3. P. 437—446.
- Yoshimura K. Disc-electrophoretic comparison between *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* adult worms // Japanese J. of Parasitol. 1968. Vol. 17. P. 382—394.
- Yoshimura K. Paragonimus: electrophoretic fractionation of whole body proteins as an aid in specific identification of a species from Sado Island, Japan // Exp. Parasitol. 1969a. Vol. 25, N 1—3. P. 107—117.
- Yoshimura K. *Paragonimus westermani*, *P. ohirai*, and *P. miyazakii*: electrophoretic comparison of whole body proteins // Exp. Parasitol. 1969b. Vol. 25, N 1—3. P. 118—130.
- Yoshimura K., Hishinuma Y., Sato M. Disc-electrophoretic patterns of adult *Paragonimus iloktsuemensis* Chen, 1940, with special reference to *P. ohirai* Miyazaki, 1939 // Japanese J. of Parasitol. 1969. Vol. 18. P. 249—257.

Мурманский морской биологический институт,
Дальние Зеленцы;
Институт цитологии,
Ленинград

Поступила 21.12.1987

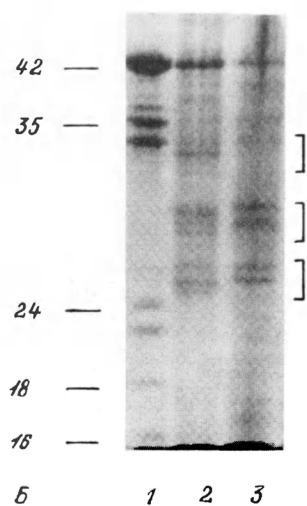
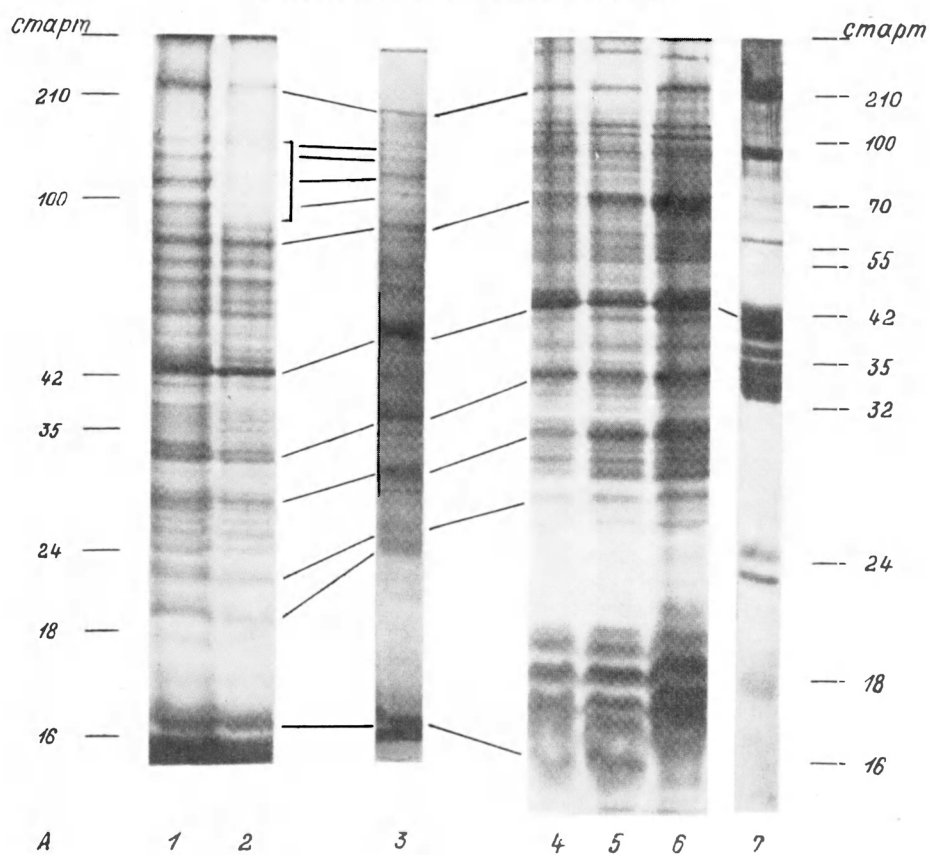
THE USE OF PROTEIN ELECTROPHORESIS FOR THE SPECIES IDENTIFICATION OF
«PYGMAEUS» GROUP MICROPHALLIDES (TREMATODA, MICROPHALLIDAE)

N. A. Mikhailova, O. I. Podgornaya, K. V. Galaktionov

S U M M A R Y

The total proteins composition of four *Microphallus* species; *M. pygmaeus*, *M. piriformes*, *M. sp. I*, *M. triangulatus* was investigated by the method of SDS-disk electrophoresis. The interspecific differences on electrophoretic gels were observed on the whole in different intensity of protein zones and only in a few areas disparity of the major proteins distribution was exposed. Such insignificant differences are assumed to be determined by a high specialisation of microphallid trematodes as well as by the likeness of their morphology and general pattern of life cycles of the studied species. The problem of origination of «pygmaeus» group microphallides in the evolutionary process is discussed.

Вклейка к ст. Н. А. Михайловой и др.



Белковый состав метацеркарий и марит трематод рода *Microphallus*.

А: 1 — *M. pygmaeus*, метацеркарии; 2, 3 — *M. sp. I*, метацеркарии; 4 — *M. piriiformes*, метацеркарии; 5 — *M. piriiformes*, мариты, 1-е сутки в среде; 6 — *M. pygmaeus*, мариты, 1-е сутки в среде; 7 — маркер молекулярных масс. Б: 1 — маркер молекулярных масс; 2 — *M. pygmaeus*, метацеркарии; 3 — *M. triangulatus*, метацеркарии. Числа — молекулярные массы белков маркерного препарата (в кД). Линии соединяют зоны аналогичных м.м. на электрофореграммах из разных опытов. Скобками отмечены области, в которых наблюдаются максимальные различия в белковом составе.